

14. 10. 99 09/787004
PCT/NL 99/00569
NL 99/569
#15
9

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN



Bureau voor de Industriële Eigendom

REC'D 02 NOV 1999

WIPO PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 15 september 1998 onder nummer 1010096,
ten name van:

CAMPINA MELKUNIE B.V.

te Woerden en

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)

te Parijs, Frankrijk

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Zuivelproduct alsmede werkwijze ter bereiding daarvan",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 15 september 1999.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

mw. I.W. Scheevelenbos - de Reus.

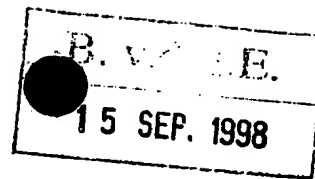
10 10096

E.E.

15 SEP. 1998

UITTREKSEL

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor
het bereiden van een zuivelproduct, waarbij een medium
omvattende melk of een melkproduct onder aërobe
omstandigheden wordt behandeld met een lactose-negatief,
levensmiddelen-technologisch aanvaardbaar microorganisme,
en vervolgens enige tijd onder anaërobe omstandigheden
wordt gehouden. Voorts heeft de uitvinding betrekking op
een zuivelproduct verkrijgbaar door die werkwijze.



VO 2048 .

Titel: Zuivelproduct alsmede werkwijze ter bereiding daarvan.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van een zuivelproduct, alsmede op een zuivelproduct verkrijgbaar door die werkwijze.

In de loop der jaren zijn er steeds meer
5 verschillende soorten zuivelproducten ontwikkeld. De consument heeft de keus uit een breed scala aan producten, zoals vla met allerhande smaken, ijs, yoghurt en yoghurtdranken, kwark, Biogarde®, zure room, slagroom en crème fraîche.

10 Een aantal van de beschikbare zuivelproducten zijn zogenaamde gefermenteerde zuivelproducten. Dit wil zeggen dat bij de bereiding van die producten een fermentatiestap wordt uitgevoerd. In een dergelijke fermentatiestap wordt het product behandeld met microorganismen en/of
15 enzymsystemen die de lactose die in het product aanwezig is in meer of mindere mate omzetten. Dergelijke fermentaties leveren, afhankelijk van het toegepaste microorganisme of mengsels van microorganismen en enzymen, een zuivelproduct op met een karakteristieke smaak en textuur. Voorbeelden
20 van gefermenteerde zuivelproducten zijn yoghurt, Biogarde®, Biomild® kwark en zure room.

Om zuivelproducten, zowel gefermenteerde als niet-gefermenteerde, een bepaalde gewenste smaak te geven kunnen diverse additieven worden toegevoegd. Veel gebruikte
25 additieven zijn zoetstoffen, smaakstoffen, geurstoffen en kleurstoffen. In producten als vla, vruchtenyoghurt en yoghurtdranken worden gebruikelijk kunstmatige additieven, vruchtensappen of plantenextracten gebruikt.

Van een aantal zuivelproducten wenst de consument
30 een naturelvariant. Hiermee wordt een zuivelproduct bedoeld dat zijn karakteristieke uiterlijk en smaak dankt aan de aard van het zuivelproduct zelf, zonder dat er additieven toegevoegd zijn. Zuivelproducten waarvan met name de

beschikbaarheid van naturelvarianten verwacht wordt, zijn yoghurt, kwark, karnemelk en dergelijke.

Uit het Amerikaanse octrooischrift 4.675.193 is een tweestapswerkwijze bekend voor de bereiding van een product met een kaassmaak. Daartoe wordt in de eerste stap een smaak ontwikkelend medium met een vetgehalte tussen 0,5 en 50% (w/v) en een eiwitgehalte tussen 0,3 en 12% (w/v), bijvoorbeeld melk of wei, behandeld met een lipase- en/of proteasebron. Deze stap wordt onder aerobe omstandigheden uitgevoerd, waarna de toegepaste lipase- en/of proteasebron wordt geïnactiveerd. In een tweede stap wordt een fermentatie met een melkzuurproducerend microorganisme uitgevoerd.

Als lipase- en/of proteasebron worden bij voorkeur non-pathogene microorganismen toegepast, zoals *Penicillium roqueforti*, *Oidium lactis* (*Geotrichum candidum*), *Cladisporium butaryl*, *Micrococcus* en *Candida lipolytica*. Bij voorkeur wordt *C. lipolytica* gebruikt.

De behandelingsstap waarbij het smaakontwikkelend medium wordt toegepast omvat een fermentatie waarbij de lipase- en/of proteasebron het medium tot een pH tussen 4,5 en 5,5 verzuurd, gevolgd door een inactivering.

Het is een doel van de uitvinding een zuivelproduct te verschaffen dat wat betreft zijn textuur overeenkomt met een bekend zuivelproduct, zoals yoghurt of kwark, maar dat een afwijkende smaak en/of geur heeft.

Verrassenderwijs is gevonden dat dergelijke zuivelproducten kunnen worden bereid door een specifiek aroma in het zuivelproduct te brengen, welk aroma geproduceerd wordt door een specifiek aeroob microorganisme dat gedurende enige tijd onder anaërobe omstandigheden wordt gehouden. Bij voorkeur wordt tijdens deze anaërobe periode een gebruikelijke fermentatie uitgevoerd.

De uitvinding betreft een werkwijze voor het bereiden van een zuivelproduct, waarbij een medium omvattende melk of een melkproduct onder aërobe

omstandigheden wordt behandeld met een lactose-negatief, levensmiddelen-technologisch aanvaardbaar microorganisme.

Het is gebleken dat in een medium dat onder aërobe omstandigheden behandeld is met een lactose-negatief, levensmiddelen-technologisch aanvaardbaar microorganisme tijdens een anaërobe periode karakteristieke aroma's worden gevormd. De aard van het aroma kan worden ingesteld door de keuze van het microorganisme binnen de klasse van lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganismen.

Het aroma dat volgens de uitvinding aan een zuivelproduct wordt verleend is afkomstig van een microorganisme dat het uitgangsmateriaal voor het te bereiden zuivelproduct weinig verandert in die zin dat lactose niet wordt omgezet. Aldus wordt een zuivelproduct verkregen dat wat betreft de textuur nagenoeg gelijk is aan bekende varianten van het bereide zuivelproduct, doch dat een geheel nieuwe smaak en/of geur heeft.

Overigens is de toepassing van een lactose-negatief microorganisme bij de bereiding van een zuivelproduct op zich bekend. Door Kwak et al. is in J. Dairy Sci., (1996) 79:937-942 een werkwijze beschreven waarbij een lactose-negatieve gist van het species *Saccharomyces cerevisiae*, wordt gebruikt om kefir te stabiliseren. Kefir is een traditionele, Russische, gefermenteerde melkdrank die een geringe hoeveelheid alcohol en kooldioxide bevat. Volgens Kwak et al. wordt het lactose-negatieve microorganisme toegepast om in een voorfase onder anaërobe omstandigheden alcohol te produceren. Na deze voorfase wordt een verzuring met melkzuurbacteriën uitgevoerd.

Het uitgangsmateriaal voor de werkwijze volgens de uitvinding is een medium omvattende melk of een melkproduct. Het is zowel mogelijk om een niet-behandelde melk te gebruiken als om een melk te gebruiken die vooraf een hitte-behandeling, zoals een pasteurisatie of een sterilisatie, heeft ondergaan.

Om uitgroei van eventueel aanwezige, contaminerende microorganismen te voorkomen, heeft het de voorkeur om uit te gaan van een melk die vooraf een hitte-behandeling heeft ondergaan.

5 Het is tevens mogelijk om een van melk afgeleid product met een aangepast vetgehalte, zoals afgeroomde melk of room, te gebruiken.

Naast de melk of het melkproduct kan, en zal het medium doorgaans voedingsstoffen voor het lactose-
 10 negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme omvatten. Deze voedingsstoffen worden gebruikelijk onderverdeeld in koolstofbronnen en stikstofbronnen. Geschikte koolstofbronnen zijn stoffen die de voor de rijping van het lactose-negatieve,
 15 levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme benodigde koolstof kunnen leveren en die compatibel zijn met het (te bereiden) zuivelproduct. Voorbeelden zijn glucose en potato dextrose broth (PDB). Geschikte stikstofbronnen zijn stoffen die de voor de rijping van het
 20 lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme benodigde stikstof kunnen leveren en geen negatief effect hebben op het (te bereiden) zuivelproduct. Voorbeelden zijn maltextract, gistextract en trypton.

25 De keuze voor de te gebruiken voedingsstoffen zal afhangen van de aard van het lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme. Wanneer het lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch
 30 aanvaardbare microorganisme een gist is, worden bij voorkeur glucose, PDB en trypton als voedingsstof gebruikt. Wanneer het lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme een bacterie is, worden bij voorkeur glucose en/of trypton als voedingsstof gebruikt.

De hoeveelheden van de voedingsstoffen in het medium
 35 dat het uitgangsmateriaal voor een werkwijze volgens de uitvinding vormt, worden afgestemd op de aard van het

lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch
aanvaardbare microorganisme. De totale hoeveelheid aan
toegevoegde, voor het aroma-vormend microorganisme
benodigde, voedingsstoffen dienen voldoende te zijn om het
5 microorganisme tot groei te brengen, doch niet zo groot te
zijn dat een ongewenst aroma of een aroma van een
ongewenste intensiteit tot stand komt. Wanneer PDB als
koolstofbron wordt gebruikt, in het geval dat het lactose-
negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare
10 microorganisme een gist is, zal de hoeveelheid hiervan
tussen 1 en 3 gram liggen. Wanneer in datzelfde geval
trypton de stikstofbron is, zal hiervan 0.2 tot 1 gram
worden gebruikt. Wanneer glucose als koolstofbron wordt
gebruikt, in het geval dat het lactose-negatieve,
15 levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme
een bacterie is, zal de hoeveelheid hiervan tussen 0,5 en 5
gram liggen. Wanneer in datzelfde geval trypton de
stikstofbron is, zal hiervan 0,2 tot 1 gram worden
gebruikt. Een en ander kan door de deskundige op eenvoudige
20 wijze proefondervindelijk worden vastgesteld.

Het microorganisme waarmee het medium volgens de
uitvinding wordt behandeld is een lactose-negatief,
levensmiddelen-technologisch aanvaardbaar microorganisme.
Hiermee wordt een microorganisme bedoeld dat niet in staat
25 is lactose om te zetten. Met andere woorden, wanneer alleen
lactose aanwezig is als koolstofbron, kan het
microorganisme niet groeien.

Bij voorkeur is het lactose-negatieve,
levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme
30 een gist of een bacterie. Bijzonder geschikte gisten zijn
afkomstig van de stammen MUH 292 *Candida zeylanoides*, MUH
293 *Candida zeylanoides*, MUH 294 *Debaryomyces hansenii* spp
hansenii, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida robusta* 218,
Candida intermedia 2a, *Saccharomyces cerevisiae* 202,
35 *Saccharomyces cerevisiae* 279, en *Zygosaccharomyces rouxii*
26,8. Bijzonder geschikte bacteriën zijn afkomstig van de

stammen *Micococcus roseus* 731, *Micrococcus luteus* CIP
(Collection de l'Institut Pasteur, Parijs) A270,
Arthrobacter ssp. 202 *Corynebacterium ssp.* G2 en
Arthrobacter ssp. 9, 10. Het is ook mogelijk om combinaties
5 van lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch
aanvaardbare microorganismen te gebruiken.

De keuze voor het lactose-negatieve, levensmiddelen-
technologisch aanvaardbare microorganisme of de combinatie
van lactose-negatieve, levensmiddelentechnologisch
10 aanvaardbare microorganismen kan geschikt worden afgestemd
op het aroma dat is gewenst. Gevonden is dat door de
behandeling met de genoemde microorganismen een breed scala
aan aroma's kan worden geproduceerd, waaronder caramel,
chocolade, kaasachtig, nootachtig, knoflook en een neutraal
15 aroma dat de smaak van het fermentatieproduct echter rijker
en ronder maakt.

Ter verkrijging van het gewenste aroma wordt het
medium omvattende de melk of het melkproduct behandeld met
het lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch
20 aanvaardbare microorganisme. Hierbij wordt het lactose-
negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare
microorganisme toegevoegd aan het medium en tot rijping
gebracht. De hoeveelheid van het lactose-negatieve,
levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme
25 kan geschikt worden afgestemd op de hoeveelheid medium en
de hoeveelheid (de sterkte) van het gewenste aroma.
Doorgaans zal het lactose-negatieve, levensmiddelen-
technologisch aanvaardbare microorganisme in een
hoeveelheid van 10^6 tot 10^7 per ml. melk of melkproduct
30 worden gebruikt.

De rijping van het lactose-negatieve,
levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme
wordt tot stand gebracht onder aërobe omstandigheden. De pH
en de temperatuur tijdens de rijping zullen afhangen van
35 het specifieke lactose-negatieve, levensmiddelen-
technologisch aanvaardbare microorganisme dat wordt

gebruikt. In de meeste gevallen zal de pH liggen tussen 6 en 7. De temperatuur zal meestal worden gekozen tussen 25. en 30°C.

Bij voorkeur wordt de rijping zodanig uitgevoerd dat ze volledig is. De duur van de rijping hangt af van de stationaire groeifase van het gebruikte microorganisme, en zal doorgaans tussen 12 en 24 uur bedragen. Dit heeft als gevolg dat de in het medium aanwezige voedingsstoffen verbruikt zijn en er geen of nauwelijks restanten van eventueel toegevoegde voedingsstoffen in het gerede zuivelproduct terecht zullen komen. Het moment waarop de rijping volledig is, kan geschikt worden bepaald door het gehalte van een of meer van de voedingsstoffen, bijvoorbeeld van glucose, te volgen. Het is tevens mogelijk om de groei van het lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme te volgen met behulp van gebruikelijke plaattellingen.

Na de rijping wordt het verkregen product enige tijd onder anaërobe omstandigheden gebracht. Het is gebleken dat in de afwezigheid van zuurstof de aroma's van de rijpingsstam worden gevormd en bijzonder goed tot uitdrukking komen.

Tijdens de aromavorming past men bij voorkeur een neutrale pH toe. In de meeste gevallen zal een periode van 5 tot 12 uur voldoende zijn om een goede aromavorming te verkrijgen.

Het aldus verkregen product is op zich voor consumptie geschikt. Het zal duidelijk zijn dat de vorming van de gewenste aroma's bijvoorbeeld kan plaatsvinden nadat het zuivelproduct is afgevuld in een houder, waar gebruikelijke anaërobe omstandigheden heersen. Veelal zal het verkregen product echter worden gethermiseerd om de houdbaarheid te vergroten. Voorts kunnen er, afhankelijk van de gewenste aard van het zuivelproduct dat wordt bereid, nog aanvullende bewerkingen worden uitgevoerd.

In een voorkeursuitvoeringsvorm vallen de anaërobe omstandigheden samen met een fermentatiestap. Na toevoeging van gebruikelijke fermentatiestammen wordt een anaërobe fermentatie uitgevoerd, waarbij lactose wordt omgezet in
5 onder andere melkzuur.

Meer in detail wordt het product dat is verkregen na de rijping van het lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare microorganisme behandeld met een melkzuurbacterie. Dankzij deze behandeling zal het
10 zuivelproduct, met name wat betreft textuur en zuurgraad, grote overeenkomsten vertonen met bekende gefermenteerde zuivelproducten, zoals yoghurt of kwark. Vanwege de verandering van de zuurgraad in een behandeling van met een melkzuurbacterie wordt deze behandeling dikwijls aangeduid
15 als verzuring.

De aard van de melkzuurbacterie zal door de vakman geschikt kunnen worden afgestemd op het gewenste product. De behandeling met de melkzuurbacterie kan op bekende wijze worden uitgevoerd en zal analoog zijn aan de behandeling
20 van een melk of melkproduct met een melkzuurbacterie in de bereiding van gefermenteerde zuivelproducten die niet zijn behandeld met een lactose-negatief, levensmiddelen-technologisch aanvaardbaar microorganisme.

Het zal duidelijk zijn dat de uitvinding tevens
25 betrekking heeft op een zuivelproduct dat kan worden bereid door een werkwijze zoals hierboven beschreven. Voorts heeft de uitvinding betrekking op de toepassing van een zuivelproduct dat volgens de uitvinding kan worden bereid in de bereiding van geautomatiseerde producten in de
30 voedingsmiddelenindustrie.

De uitvinding zal thans nader worden toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden.

Voorbe ld 1**Giststammen:**

L1 (MUH292) *Candida zeylanoides* (vlg. CBS) uit ampul

L3 (MUH293) *Candida zeylanoides* (vlg. CBS) uit ampul

5 **Bacteriestam:**

B3 (MUH296) *Arthrobacter ssp.* vanaf plaat

G8 (MUH300) *Arthrobacter ssp.* vanaf plaat

H8 (MUH301) *Arthrobacter ssp.* vanaf plaat

Glucose-oplossing:

10 8 gram glucose per 100 g water (filter
gesteriliseerd).

Gistmedium:

24 g potato dextrose broth (PDB van Difco 0549-17-9)

+ 5 gram trypton per liter water.

15 **Bacteriemedium:**

5 gram trypton per 900 ml water. Gesteriliseerd bij

120°C gedurende 15 min en verrijkt met 100 ml glucose-
oplossing

Substraat:

20 volle UHT-melk.

Opkweek

Een kolonie lactose-negatieve microorganismen wordt
toegevoegd aan water met glycerol en de oplossing wordt
25 verdeeld over meerdere ampullen en ingevroren. Vervolgens
wordt 1 ml ontdooid medium toegevoegd aan 25 ml gist of
bacteriemedium in een erlenmeijer van 100 ml. De
erlenmeijer wordt afgesloten met cellulose watten en
gedurende 72 uur aeroob bij 25°C (gisten) en 30°C
30 (bacteriën) weggezet met een schudsnelheid van 200 rpm.

Voorkweek

5 ml opkweekmedium wordt toegevoegd aan 45 ml volle
UHT-melk (substraat) in een erlenmeijer van 250 ml welke
afsluitbaar is met watten. Deze oplossing wordt 24 uur of
35 12 uur onder schudden bij 200 rpm en de juiste temperatuur

aeroob weggezet. Nadat de voorkweek is afgerond, worden de media gekoeld tot ca. 7°C.

Resultaat

Na een aerobe groei van de lactose-negatieve, levensmiddelen-technologisch aanvaardbare gist *Candida zeylanoides* en een anaerobe aromavorming in melk ontstaat een product met een onderscheidende smaak, die is te associëren met Münsterkaas (stalsmaak). Als wordt uitgegaan van de lactose-negatieve bacterie *Arthrobacter* dan ontstaat, na een anaerobe aromavorming in melk, een chocoladesmaak.

Voorbeeld 2

Giststammen:

- 15 L1 (MUH292) *Candida zeylanoides* (vlg. CBS) uit ampul
L3 (MUH293) *Candida zeylanoides* (vlg. CBS) uit ampul

Bacteriestam:

- B3 (MUH296) *Arthrobacter* ssp. vanaf plaat
G8 (MUH300) *Arthrobacter* ssp. vanaf plaat
20 H8 (MUH301) *Arthrobacter* ssp. vanaf plaat

Melkzuurbacteriën:

Voor de bereiding van yoghurt

Glucose-oplossing:

- 8 gram glucose per 100 g water (filter
25 gesteriliseerd).

Gistmedium:

24 g potato dextrose broth (PDB van Difco 0549-17-9)
+ 5 gram trypton per liter water.

Bacteriemedium:

- 30 5 gram trypton per 900 ml water. Gesteriliseerd bij
120°C gedurende 15 min en verrijkt met 100 ml glucose-
oplossing.

Substraat:

volle UHT-melk.

Opkweek

Een kolonie lactose-negatieve microorganisme wordt toegevoegd aan water met glycerol en de oplossing wordt voorts verdeeld over meerdere ampullen en ingevroren.

- 5 Vervolgens wordt 1 ml ontdooid medium toegevoegd aan 25 ml gist of bacteriemedium in een erlenmeijer van 100 ml. De erlenmeijer wordt afgesloten met cellulose watten en gedurende 72 uur aeroob bij 25°C (gisten) en 30°C (bacteriën) weggezet met een schudsnelheid van 200 rpm.

10 **Voorkweek**

- 5 ml opkweekmedium wordt toegevoegd aan 45 ml volle UHT-melk (substraat) in een erlenmeijer van 250 ml welke afsluitbaar is met watten. Deze oplossing wordt 24 uur of 12 uur onder schudden bij 200 rpm en de juiste temperatuur
15 aeroob weggezet. Nadat de voorkweek is afgerond, worden de media gekoeld tot ca 7°C.

Verzuring

- De voorkweek wordt onder anaerobe omstandigheden verzuurd met een yoghurtcultuur bij 37°C tot eind-pH 4,5 en
20 voorts gekoeld (tot ca. 5-7°C) afgevuld.

Resultaat

- Wanneer beide producten die zijn verkregen in Voorbeeld I met melkzuurbacteriën worden verzuurd, ontstaan er producten met een consistentie vergelijkbaar met die van
25 yoghurt en een onderscheidende smaak, die duidelijk verschilt van de smaak van een niet-voorbehandeld, verzuurd melkproduct.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het bereiden van een zuivelproduct, waarbij een medium omvattende melk of een melkproduct onder aërobe omstandigheden wordt behandeld met een lactose-negatief, levensmiddelentechnologisch aanvaardbaar microorganisme, en vervolgens gedurende enige tijd onder anaërobe omstandigheden wordt gehouden.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij het microorganisme een gist of een bacterie is.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, waarbij de gist afkomstig is van de stam MUH 292 *Candida zeylanoides*, MUH 293 *Candida zeylanoides*, MUH 294 *Debaryomyces hansenii* spp *hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida robusta* 218, *Candida intermedia* 2a, *Saccharomyces cerevisiae* 202, *Saccharomyces cerevisiae* 279, of *Zygosaccharomyces rouxii* 26,8.
4. Werkwijze volgens conclusie 2, waarbij de bacterie afkomstig is van de stam *Micococcus roseus* 731, *Micrococcus luteus* CIP A270, *Arthrobacter* 202, *Corynebacterium* G2 of *Arthrobacter* ssp. 9,10.
5. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij het medium onder anaërobe omstandigheden wordt behandeld met een levensmiddelen-technologisch aanvaardbare melkzuurbacterie.
6. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het zuivelproduct wordt gethermiseerd.
7. Zuivelproduct verkrijgbaar door een werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies.
8. Toepassing van een lactose-negatief, levensmiddelen-technologisch aanvaardbaar microorganisme voor het verlenen van een aroma aan een zuivelproduct.
9. Toepassing van een zuivelproduct volgens conclusie 7 voor de bereiding van een gearomatiseerd product in de voedingsmiddelenindustrie.